

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-159091

(43)Date of publication of application : 03.06.2003

(51)Int.Cl.

C12P 7/56
C12N 1/00
// (C12P 7/56
C12R 1:13)
(C12P 7/56
C12R 1:01)

(21)Application number : 2001-361530

(71)Applicant : INOBAKKUSU KK

(22)Date of filing : 27.11.2001

(72)Inventor : YUGAWA HIDEAKI

(54) METHOD FOR PRODUCING LACTIC ACID

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a lactic acid production technique by fermentation method so as to effect high production efficiency.

SOLUTION: This method for producing lactic acid comprises the steps of culturing lactic acid-producing bacteria in the presence of an externally added pyruvic acid to produce the lactic acid in the medium and then collecting the thus produced lactic acid.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

08.11.2004

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the
examiner's decision of rejection or application converted
registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of
rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of
rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

Best Available Copy

* NOTICES *

JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] The manufacture approach of the lactic acid characterized by extracting the lactic acid which cultivated the lactic-acid generation bacillus under existence of the pyruvic acid added from the exterior, was made to generate a lactic acid in a culture medium, and was generated.

[Claim 2] The manufacture approach of the lactic acid according to claim 1 characterized by a lactic-acid generation bacillus belonging to Corynebacterium.

[Claim 3] The manufacture approach of the lactic acid according to claim 2 characterized by a lactic-acid generation bacillus being Corynebacterium guru TAMIKAMU.

[Claim 4] The manufacture approach of the lactic acid according to claim 1 characterized by a lactic-acid generation bacillus belonging to Brevibacterium.

[Claim 5] The manufacture approach of the lactic acid according to claim 4 characterized by a lactic-acid generation bacillus being a BUREBI bacterium RAKUTO fur mentum.

[Claim 6] The lactic acid obtained by the approach of cultivating a lactic-acid generation bacillus under existence of the pyruvic acid added from the exterior, making generate a lactic acid in a culture medium, and extracting from a culture medium.

[Claim 7] The lactic-acid generation accelerator characterized by containing a pyruvic acid.

[Translation done.]

* NOTICES *

JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention] This invention relates to the lactic-acid manufacture approach using a specific fermentation (lactic-acid generation reaction) accelerator that productive efficiency is high.

[0002]

[Description of the Prior Art] The lactic acid is used for manufacture of sake, beer, a soft drink, pickles, soy sauce, or bread-making as a food additive, and is further used also as chemistry raw materials, such as drugs, agricultural chemicals, or cosmetics. The ester which are the derivatives of a lactic acid, such as ethyl lactate and butyl lactate, is used also as a solvent with high safety, and a cleaning agent. And growth of the future [polylactic acid / which is the polymer of a lactic acid / application / a biodegradability polymer application, / of a living body adaptation medical polymer ingredient] is expected. The lactic acid is useful as these chemistry raw materials.

[0003] Before, lactic-acid manufacture by bacterial coupling is performed using the fermentation of the various microorganisms which have lactic-acid generative capacity by using the saccharide from cane sugar, grape sugar, and starch and the cellulose system matter as a raw material. However, fermentation productive efficiency, such as a generation rate, is still insufficient, and amelioration about this point is desired.

[0004] Then, the approach of adding a yeast extract, a peptone, a meat extract, a malt extract, etc. to a fermentation culture medium for the purpose of raising the productive efficiency of a lactic acid in the case of lactic acid fermentation is learned well. Although it is thought that adding these matter is offering the growth essential nutrient of the microorganism which mainly contains a vitamin, amino acid, a nucleic acid, minerals, etc., the reason whose effectiveness of lactic-acid-fermentation production improves within a microorganism with these compounds is not clear.

[0005] Moreover, adding the soybean protein hydrolysis product (soy bean hydrolyzate) which contains a mevalonic acid (mevalonic acid) and various kinds of amino acid in a fermentation culture medium for the purpose of gathering the production rate of a lactic acid is also known (608 Bioscience Biotechnology & Biochemistry, 61(4):604- 1997). However, the reason the rate of lactic acid fermentation increases about these additives similarly too is not clear.

[0006]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] The purpose of this invention is to offer the lactic-acid manufacturing technology by the bacterial coupling which can do so high productive efficiency with the compound with which having the effectiveness of raising the productive efficiency of lactic acid fermentation until now was not known.

[0007]

[Means for Solving the Problem] As a result of this invention person's inquiring wholeheartedly about the matter which promotes lactic acid fermentation (the phrase "fermentation" fermentation [which is used by this invention] becoming also means a lactic-acid generation reaction without growth of the microorganism to be used), it found out that the productive efficiency of a lactic acid improved remarkably by adding the specific compound with which the lactic-acid generation promotion operation was not conventionally known by the fermentation culture medium. The specific compound of this invention is a pyruvic acid (pyruvic acid). It is shown clearly that a lactic acid generates the lactic acid fermentation from the saccharide by the lactic-acid generation bacillus from the pyruvic acid generated by the glycolytic pathway in the microorganism inside of the body. Although the pyruvic acid added by the fermentation culture medium of this invention was the same compound as the pyruvic acid generated by glycolytic pathway, it turned out that this addition pyruvic acid has the effectiveness which cannot be expected at all. Usually, in a general chemical reaction system, the augend of the reacting matter of a raw material system brings about increase of the matter of a product. However, the amount of increases of the product does not exceed the augend of a raw material system.

[0008] However, in this invention, by adding a pyruvic acid to a fermentation culture medium, it becomes remarkably high, and the effectiveness continues continuously and a lactic-acid generation rate also increases notably as compared with an additive-free case rather than the amount of lactic acids to which increase of the amount of generation of a lactic acid originates in the pyruvic acid added by the fermentation culture medium. And the output rate of a glucose also increases. That is, the pyruvic acid added by the fermentation culture medium has the effectiveness like the priming when pumping up well water. The reason the pyruvic acid added by the fermentation culture medium has such effectiveness is not clear. However, the reason like the following can be considered as a reason of the effectiveness presumed.

[0009] From a pyruvic acid, a lactic acid faces that fermentation generation is carried out, and consumption of

NADH (nicotinamide adenine dinucleotide reduction type) participates in this reaction. On the other hand, it is thought that NADH is the inhibitor of the enzyme which carries out the catalyst of the reaction from the glyceraldehyde 3-phosphate which is the precursor of the pyruvic acid in glycolytic pathway to a pyruvic acid. Therefore, when a pyruvic acid is added by the lactic-acid-fermentation culture medium from the outside of glycolytic pathway, as a result of consuming NADH and canceling catalyst inhibition, as compared with pyruvic-acid addition before, the reaction path from glyceraldehyde 3-phosphate to a pyruvic acid and a lactic acid advances smoothly according to a rank, and is presumed whether lactic-acid generation is promoted. Of course, this invention is not limited to such a reason for presumption.

[0010] Namely, this invention (1) A lactic-acid generation bacillus is cultivated under existence of the pyruvic acid added from the exterior. The manufacture approach of the lactic acid characterized by extracting the lactic acid which was made to generate a lactic acid in a culture medium, and was generated, (2) The manufacture approach of the lactic acid the above-mentioned (1) publication characterized by a lactic-acid generation bacillus belonging to *Corynebacterium*, (3) The manufacture approach of the lactic acid the above-mentioned (2) publication characterized by a lactic-acid generation bacillus being *Corynebacterium* guru TAMIKAMU, (4) The manufacture approach of the lactic acid the above-mentioned (1) publication characterized by a lactic-acid generation bacillus belonging to *Brevibacterium*, (5) The manufacture approach of the lactic acid the above-mentioned (4) publication characterized by a lactic-acid generation bacillus being a BUREBI bacterium RAKUTO fur mentum, (6) lactic-acid generation bacillus is cultivated under existence of the pyruvic acid added from the exterior (with "culture" in this invention). Lactic acid obtained by the approach of also including and carrying out semantics of performing matter production without growth of a microorganism, making generate a lactic acid in a culture medium, and extracting from a culture medium (7) It is related with the lactic-acid generation accelerator characterized by containing a pyruvic acid.

[0011]

[Embodiment of the Invention] If it removes that this invention adds a specific compound to a fermentation culture medium, a well-known lactic-acid-fermentation technique can be used, and there is especially no limit. Moreover, this invention offers the lactic-acid manufacture approach of the effectiveness from Takao by adding the pyruvic acid of the specified quantity to a fermentation culture medium.

[0012] As long as generation of a lactic acid is accepted to be the fermentation of this invention, you may carry out by any under an anaerobic condition or aerobic conditions. It is suitably chosen with the microorganism kind which whether it ferments under an anaerobic condition or it carries out under aerobic conditions use. The fermentation culture medium of this invention means the "place" where generation of a lactic acid is performed on an anaerobic condition or aerobic conditions, and as usually shown with the microorganism kind used at the "place" by generation of the lactic acid accompanied by growth of a microorganism, or the example which carries out a postscript, lactic-acid generation without growth of a microorganism is performed.

[0013] An anaerobic condition can be carried out by aeration, such as carbon dioxide gas and inert gas (nitrogen gas, argon gas, etc.), or the approach of non-aeration. Moreover, the aeration of the gas containing oxygen gas can perform aerobic conditions.

[0014] The fermentation micro organism used by this invention can also use the thing extracted from the nature which has the capacity which generates L-lactic acid or D-lactic acid under existence of a saccharide, or whether a transformation is carried out so that a lactic-acid generation gene may function and the becoming microorganism. Specifically For example, a RAKUTO bacillus (*Lactobacillus*) group, A streptococcus (*Streptococcus*) group, a PEDIOKOKKASU (*Pediococcus*) group, An AEROKOKKASU (*Aerococcus*) group, a KARUBO bacterium (*Carbobacterium*) group, An enterococcus (*Enterococcus*) group, an ERISHIPEROTORIKKUSU (*Erysiplothorix*) group, The Gemella (*Gemella*) group, a grotesque BIKATERA (*Globicatella*) group, A RAKUTOKOKKASU (*Lactococcus*) group, the Leuconostoc (*Leuconostoc*) group, A tetra-GENOKOKKASU (*Tetragenococcus*) group, a VAGOKOKKASU (*Vagococcus*) group, A coryneform group of bacteria (*Corynebacterium*, *Brevibacterium*), The Mycobacterium (*Mycobacterium*) group, the Arthrobacter (*Arthrobacter*) group, The microorganism belonging to an ESHIERICHIA (*Escherichia*) group, a Serratia (*Serratia*) group, an ANAEROBIOSUPIRAMU (*Anaerobioapirillum*) group, and the Rhizopus (*Rhizopus*) group can be mentioned, in addition detailed algae can also be used.

[0015] As an example of the above-mentioned transformation microorganism, recombination yeast (Appl.Environ.Microbiol., 1999, Sep;65(9);4211-4215), recombination *Escherichia coli* (Appl.Environ.Microbiol., 1999, Apr;65(4);1384-1389), etc. can be mentioned. Even when the microorganism which has these lactic-acids generation ability is independent one kind, it is good, and it can also mix and use two or more sorts. In addition, when the lactic acid manufactured by the approach of this invention with a natural thing is used for the application of a food additive etc., use of a pathogenic microorganism should be avoided also in the above-mentioned use microorganism.

[0016] the utilization carbon source saccharide from which the pyruvic acid which are the requirements for an indispensable configuration of this invention becomes a fermentation culture medium in the lactic-acid manufacture approach of this invention with the raw material of lactic-acid generation — receiving — about — 1 / 2000 mole ratios — 1 / 2 mole-ratio extent (when polysaccharide is used, it is a conversion mole ratio to monosaccharide) — desirable — about — it is added with 1 / 500 mole ratios — 1 / 5 mole-ratio extent. The productive efficiency of a lactic acid is notably raised by addition of this pyruvic acid.

[0017] The pyruvic acid used by this invention may be the gestalt of the acid of isolation, for example, may be the gestalt of salts, such as sodium salt and potassium salt.

[0018] As a utilization carbon source of other fermentation culture media, as long as each what are conventionally

well-known can use it, a fermentation micro organism grows and a lactic acid is generated as a utilization carbon source of the microorganism which has lactic-acid generative capacity, it is suitably chosen by the use microorganism. As a utilization carbon source, a glucose, a maltose, corn starch, a blackstrap molasses, corn steep liquor, the saccharide from the cellulose system matter, etc. are used, for example.

[0019] Moreover, as a nitrogen source, a urea, a yeast extract, HEPUTON, a whey, etc. are used. Moreover, potassium phosphate, magnesium sulfate, Fe (iron), Mn (manganese) compound, etc. are used as an inorganic substance nutrient. Furthermore, pH regulator of a culture medium can also be used.

[0020] Any generation method of a batch process and continuous system is possible for generation of a lactic acid. Moreover, the generation method which supports a fermentation micro organism to immobilization support is also possible. For performing lactic acid fermentation, the microorganism which has lactic-acid generation ability in the above-mentioned culture medium is inoculated, for example, a culture medium pH is preferably performed about by about five to eight about two to about nine. Although not limited especially concerning lactic-acid generation temperature, it is usually carried out at about about 20-40 degrees C. However, depending on the fermentation micro organism to be used, it is possible also at still higher temperature. It is not limited, especially concerning the reaction time which lactic-acid generation takes, but as long as the effectiveness of this invention is accepted, it carries out by the generation reaction time of arbitration. Optimization of these conditions can be easily defined in this contractor.

[0021] Although this invention becomes by extracting the lactic acid which carried out in this way and was generated, the well-known approach used in the manufacture process by the conventional lactic acid fermentation as a separation concentration means of a lactic acid can be used. The organic solvent extraction method using solvents which consist of such a well-known approach adding for example, 1 milk of lime, and neutralizing, such as the calcium-lactate recrystallizing method and the 2 ether, the esterification separation method which esterifies 3 generation lactic acid in alcohol, the chromatography separation method using 4 ion exchange resin, the electrodialysis process using 5 ion exchange membrane, etc. are mentioned. Therefore, the lactic acid obtained by the approach of this invention may be the gestalt of ester, such as a salt not only with the lactic acid of an isolation mold but sodium, a potassium, etc., and methyl ester, ethyl ester.

[0022]

[Example] Hereafter, although it explains that this invention is also at an example, this invention is not limited to such an example.

[0023] [Example 1]

Generation and 4g of extraction ureas of a lactic acid by *Corynebacterium guru* TAMIKAMU (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC13032, 2SO414g, KH2PO4 0.5g, K2HPO4 0.5g, (NH4) MgSO4.7H2O 0.5g, FeSO4.7H2O 20mg, MnSO4, 2020 mg nH, and D-biotin 200microg, thiamin hydrochloride 100microg, 1g of yeast extracts, 1g of casamino acids, and the culture medium of 500ml of distilled water (pH6.6) are poured distributively to the Erlenmeyer flask of every 100ml 500ml **. 4ml of 120 degrees C of glucose water solutions is added to what carried out sterilization processing for 15 minutes 50 sterilized%. Inoculation of *Corynebacterium guru* TAMIKAMU (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC13032 was carried out, and shaking culture was carried out at 33 degrees C for 14 hours (aerobic culture). Centrifugal separation (8000g, 20 minutes) recovered the fungus body after culture termination. The obtained fungus body whole quantity was offered as a sample for the following reactions.

[0024] 2SO4 23g, KH2PO4 0.5g, K2HPO4 0.5g, (NH4) MgSO4.7H2O 0.5g, FeSO4.7H2O 20mg, MnSO4, 2020 mg nH, and D-biotin 200microg, thiamin hydrochloride 100microg, The culture medium of 500ml of distilled water is put into the jar fermenter of 1L **, glucose 180mM is added as a utilization carbon source, and the whole quantity of the above-mentioned fungus body was stirred loosely (200rpm), and was made to react in 33 degrees C in the condition of having sealed moreover, after adding pyruvic-acid sodium 10mM. When centrifugal separation of the culture medium was carried out 4 hours after (8000rpm, 15 minutes, 4 degrees C) and the obtained digestive liquor was analyzed, the amounts of lactic-acid generation were 77.4mM(s). Moreover, glucose consumption was 64.1mM(s).

[0025] [Example 2] Except having changed the - [example 5] lactic-acid generation reaction time into reaction time given in Table 1, respectively, it carried out on the completely same approach as an example 1, and conditions, and these reaction results were shown in Table 1.

[0026] [Example 1 of a comparison] The completely same reaction as an example 1 was performed by the reaction time shown in Table 1 without adding pyruvic-acid sodium to - [example 5 of comparison] system of reaction. These reaction results were shown in Table 1.

[0027]

[Table 1]

実施例番号		2	1	3	4	5
反応時間(h r)		2	4	6	8	10
反応結果						
添加 (10mM)	乳酸生成量(A) (mM)	38.2	77.4	114.3	149.8	182.2
	グルコース消費量(B) (mM)	32.6	64.1	97.0	120.5	143.7
比較例番号		1	2	3	4	5
反応時間(hr)		2	4	6	8	10
反応結果						
添加 なし	乳酸生成量(C) (mM)	13.0	26.1	39.1	52.1	65.1
	グルコース消費量(D) (mM)	10.5	20.4	30.6	40.7	50.9
添加効果	乳酸生成量増大(mM) [(A) - (C)]	25.2	51.3	75.2	97.7	117.1
	グルコース消費量 増大(mM) [(B) - (D)]	22.1	43.7	66.4	79.8	92.8

[0028] The effectiveness that the amount of lactic-acid generation increases remarkably rather than the added amount of pyruvic-acid sodium is accepted, and the lactic-acid generation rate is improving notably so that clearly from Table 1. And glucose consumption and an output rate are greatly raised by pyruvic-acid addition. Moreover, it is also clear that such pyruvic-acid addition effectiveness is continuing over long duration.

[0029] [Example 6] Except setting the addition of pyruvic-acid sodium to 30mM(s), the same reaction approach was carried out by microorganism kind *Corynebacterium guru* TAMIKAMU (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC13032 used in the example 1, and the lactic-acid generation reaction was carried out according to conditions. Reaction time is performed in 2 hours and shows these results in Table 2.

[0030] [Example 7] Except setting the addition of pyruvic-acid sodium to 30mM(s), the same reaction approach was carried out by microorganism kind *Corynebacterium guru* TAMIKAMU (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC13032 used in the example 1, and the lactic-acid generation reaction was carried out according to conditions. Reaction time is performed in 4 hours and shows these results in Table 2.

[0031]

[Table 2]

実施例番号		6	7
反応時間(hr)		2	4
反応結果			
添加 (30 mM)	乳酸生成量(A) (mM)	43.6	88.7
	グルコース消費量(B) (mM)	35.8	71.3
比較例番号		1	2
反応時間(hr)		2	4
反応結果			
添加 なし	乳酸生成量(C) (mM)	13.0	26.1
	グルコース消費量(D) (mM)	10.5	20.4
添加効果	乳酸生成量増大(mM) [(A) - (C)]	30.6	62.6
	グルコース消費量 増大(mM) [(B) - (D)]	25.3	50.9

[0032] Increase of the remarkable amount of lactic-acid generation and glucose consumption is accepted, and those rates are also increasing very greatly as made clear also from Table 2.

[0033] [Example 8]

According to the same approach as the production example 1 of the lactic acid by the BUREBIBAKUTERIU RAKUTO fur mentum (Brevibacterium lactofermentum) ATCC13869, and conditions, the lactic-acid generation reaction was aerobically performed for the BUREBIBAKUTERIU RAKUTO fur mentum (Brevibacterium lactofermentum) ATCC13869 in aversion on the same approach as an example 1, and conditions after culture. Reaction time was performed in 2 hours. The result of having analyzed reaction mixture is shown in Table 3 after reaction termination.

[0034] [Example 9] According to the same approach as an example 1, and conditions, the lactic-acid generation reaction was aerobically performed for the BUREBIBAKUTERIU RAKUTO fur mentum (Brevibacterium lactofermentum) ATCC13869 in aversion on the same approach as an example 1, and conditions after culture. Reaction time was performed in 4 hours. The result of having analyzed reaction mixture is shown in Table 3 after reaction termination.

[0035] [Example 10] According to the same approach as an example 1, and conditions, the lactic-acid generation reaction was aerobically performed for the BUREBIBAKUTERIU RAKUTO fur mentum (Brevibacterium lactofermentum) ATCC13869 in aversion on the same approach as an example 1, and conditions after culture. Reaction time was performed in 6 hours. The result of having analyzed reaction mixture is shown in Table 3 after reaction termination.

[0036] [Example 11] According to the same approach as an example 1, and conditions, the lactic-acid generation reaction was aerobically performed for the BUREBIBAKUTERIU RAKUTO fur mentum (Brevibacterium lactofermentum) ATCC13869 in aversion on the same approach as an example 1, and conditions after culture. Reaction time was performed in 8 hours. The result of having analyzed reaction mixture is shown in Table 3 after reaction termination.

[0037] [Example 12] According to the same approach as an example 1, and conditions, the lactic-acid generation reaction was aerobically performed for the BUREBIBAKUTERIU RAKUTO fur mentum (Brevibacterium lactofermentum) ATCC13869 in aversion on the same approach as an example 1, and conditions after culture. Reaction time was performed in 10 hours.

[0038] [Example 6 of a comparison] If it removed not adding pyruvic-acid sodium, according to the approach of an

example 8, and conditions, the lactic-acid generation reaction was performed in reaction-time 2 hours using the BUREBIBAKUTERIU RAKUTO fur mentum (Brevibacterium lactofermentum) ATCC13869 used in the example 8. The result of having analyzed reaction mixture is shown in Table 3 after reaction termination.

[0039] [Example 7 of a comparison] If it removed not adding pyruvic-acid sodium, according to the approach of an example 8, and conditions, the lactic-acid generation reaction was performed in reaction-time 4 hours using the BUREBIBAKUTERIU RAKUTO fur mentum (Brevibacterium lactofermentum) ATCC13869 used in the example 8. The result of having analyzed reaction mixture is shown in Table 3 after reaction termination.

[0040] [Example 8 of a comparison] If it removed not adding pyruvic-acid sodium, according to the approach of an example 8, and conditions, the lactic-acid generation reaction was performed in reaction-time 6 hours using the BUREBIBAKUTERIU RAKUTO fur mentum (Brevibacterium lactofermentum) ATCC13869 used in the example 8. The result of having analyzed reaction mixture is shown in Table 3 after reaction termination.

[0041] [Example 9 of a comparison] If it removed not adding pyruvic-acid sodium, according to the approach of an example 8, and conditions, the lactic-acid generation reaction was performed in reaction-time 8 hours using the BUREBIBAKUTERIU RAKUTO fur mentum (Brevibacterium lactofermentum) ATCC13869 used in the example 8. The result of having analyzed reaction mixture is shown in Table 3 after reaction termination.

[0042] [Example 10 of a comparison] If it removed not adding pyruvic-acid sodium, according to the approach of an example 8, and conditions, the lactic-acid generation reaction was performed in reaction-time 10 hours using the BUREBIBAKUTERIU RAKUTO fur mentum (Brevibacterium lactofermentum) ATCC13869 used in the example 8. The result of having analyzed reaction mixture is shown in Table 3 after reaction termination.

[0043]

[Table 3]

実施例番号		8	9	10	11	12
反応時間(hr)		2	4	6	8	10
反応結果						
添加 (10mM)	乳酸生成量(A) (mM)	37.5	76.0	111.2	144.9	176.1
	グルコース消費量(B) (mM)	31.5	62.1	93.8	117.1	139.1
比較例番号		6	7	8	9	10
反応時間(hr)		2	4	6	8	10
反応結果						
添加 なし	乳酸生成量(C) (mM)	12.5	25.0	38.0	50.2	62.8
	グルコース消費量(D) (mM)	10.0	19.5	29.5	39.1	50.1
添加効果	乳酸生成量増大(mM) [(A) - (C)]	25.0	51.0	73.2	94.7	113.3
	グルコース消費量 増大(mM) [(B) - (D)]	21.5	42.6	64.3	78.0	89.0

[0044] From Table 3, it did not depend on a microorganism kind but it was shown clearly that the pyruvic-acid addition effectiveness was discovered.

[0045]

[Effect of the Invention] By the lactic-acid manufacture approach of this invention, the productive efficiency of a lactic acid can be remarkably raised in the case of lactic acid fermentation, and the lactic acid which has good flavor can be obtained. This lactic acid can be used as a food additive as chemistry raw materials, such as manufacture of sake, Biel, a soft drink, pickles, soy sauce, or bread-making, drugs, agricultural chemicals, or cosmetics.

[Translation done.]

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-159091

(P2003-159091A)

(43) 公開日 平成15年6月3日(2003.6.3)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード [*] (参考)
C 1 2 P 7/56		C 1 2 P 7/56	4 B 0 6 4
C 1 2 N 1/00		C 1 2 N 1/00	F 4 B 0 6 5
// (C 1 2 P 7/56		C 1 2 R 1:13	
C 1 2 R 1:13)		1:01	
(C 1 2 P 7/56			

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 7 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2001-361530(P2001-361530)	(71) 出願人 598105628 イノバックス株式会社 東京都千代田区外神田 3 丁目 7 番 3 号 東 冷ビル401号
(22) 出願日	平成13年11月27日(2001.11.27)	(72) 発明者 湯川 英明 京都府相楽郡木津町木津川台 9 丁目 2 番地 財団法人地球環境産業技術研究所内
		(74) 代理人 100077012 弁理士 岩谷 龍
		F ターム(参考) 4B064 AD33 CA02 CC09 CD07 DA10 4B065 AA22X BB08 BB15 BC01 CA10 CA41 CA60

(54) 【発明の名称】 乳酸の製造方法

(57) 【要約】

【課 題】 高い生産効率を奏することができる発酵法による乳酸製造技術を提供すること。

【解決手段】 乳酸生成菌を外部より添加されるピルビン酸の存在下に培養して、培地中に乳酸を生成させ、生成した乳酸を採取することを特徴とする乳酸の製造方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 乳酸生成菌を外部より添加されるピルビン酸の存在下に培養して、培地中に乳酸を生成させ、生成した乳酸を採取することを特徴とする乳酸の製造方法。

【請求項2】 乳酸生成菌がコリネバクテリウム属に属することを特徴とする請求項1記載の乳酸の製造方法。

【請求項3】 乳酸生成菌がコリネバクテリウム・グルタミカムであることを特徴とする請求項2記載の乳酸の製造方法。

【請求項4】 乳酸生成菌がブレバクテリウム属に属することを特徴とする請求項1記載の乳酸の製造方法。

【請求項5】 乳酸生成菌がブレバクテリウム・ラクトファーメンタムであることを特徴とする請求項4記載の乳酸の製造方法。

【請求項6】 乳酸生成菌を外部より添加されるピルビン酸の存在下に培養して、培地中に乳酸を生成させ、培地から採取する方法により得られる乳酸。

【請求項7】 ピルビン酸を含有することを特徴とする乳酸生成促進剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は特定の発酵（乳酸生成反応）促進剤を用いる生産効率の高い乳酸製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 乳酸は食品添加剤として清酒、ビール、清涼飲料、漬物、醤油あるいは製パンなどの製造に利用されており、さらに、医薬品、農薬あるいは化粧品などの化学原料としても利用されている。乳酸の誘導体である乳酸エチルや乳酸ブチルなどのエステル類は安全性の高い溶剤、洗浄剤としても使用されている。そして乳酸のポリマーであるポリ乳酸は生分解性ポリマー用途や生体適合医用高分子材料の用途などに将来の成長が期待されているものである。乳酸は、これらの化学原料として有用である。

【0003】 従来より、発酵法による乳酸製造は、ショ糖、ブドウ糖、澱粉やセルロース系物質からの糖類を原料として乳酸生成能力を有する種々の微生物の発酵を利用して行われている。しかし生成速度など発酵生産効率が未だ不十分であり、この点についての改良が望まれている。

【0004】 そこで、乳酸の生産効率を向上させることを目的として、乳酸発酵の際に、発酵培地に酵母エキス、ペプトン、肉エキスや麦芽エキスなどを添加する方法がよく知られている。これらの物質を添加することは、主としてビタミン、アミノ酸、核酸および無機質などを含む微生物の増殖必須栄養素を提供することであると考えられているが、これらの化合物によって微生物内で乳酸発酵生産の効率が向上する理由は明らかにはされ

ていない。

【0005】 また、乳酸の生産速度を上げることを目的として、発酵培地にメバロン酸 (mevalonic acid) や各種のアミノ酸を含む大豆蛋白加水分解生成物 (soy bean hydrolyzate) を添加することも知られている (Bioscience Biotechnology & Biochemistry, 61(4):604-608, 1997)。しかし、やはり同様にこれらの添加物について乳酸発酵の速度が増大する理由は明らかではない。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の目的は、これまで乳酸発酵の生産効率を向上させる効果を有することが知られていなかった化合物による高い生産効率を奏することができる発酵法による乳酸製造技術を提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】 本発明者は乳酸発酵（本発明で使用する「発酵」なる語句は、使用する微生物の増殖を伴わない乳酸生成反応をも意味する）を促進する物質に関して鋭意研究を行った結果、発酵培地に乳酸生成促進作用が従来知られていなかった、特定の化合物を添加することにより乳酸の生産効率が著しく向上することを見出した。本発明の特定の化合物とはピルビン酸 (pyruvic acid) である。乳酸生成菌による糖類からの乳酸発酵は、微生物体内での解糖経路で生成するピルビン酸より乳酸が生成することが明らかにされている。本発明の発酵培地に添加されるピルビン酸は解糖経路で生成するピルビン酸と同一の化合物であるが、該添加ピルビン酸は全く予期できない効果を有することが判った。通常、一般の化学反応系においては、原料系の反応物質の増加量は生成系の物質の増大をもたらす。しかし、その生成系の増大量は原料系の増加量を超えるものではない。

【0008】 しかるに、本発明においては、ピルビン酸を発酵培地に添加することにより、乳酸の生成量の増大が発酵培地に添加されたピルビン酸に由来する乳酸量よりも著しく高くなり、その効果が持続的に継続し、乳酸生成速度も無添加の場合に比して顕著に増大する。そして、グルコースの消費速度も増大するのである。つまり、発酵培地に添加されたピルビン酸はあたかも井戸水を汲み上げるときの呼び水の如き効果を有しているのである。発酵培地に添加されるピルビン酸がこのような効果を有する理由は明らかではない。しかし、推定される効果の理由として下記の如き理由が考えられる。

【0009】 ピルビン酸より乳酸が発酵生成されるに際しては、この反応にNADH (ニコチンアミド・アデニン・ジヌクレオチド還元型) の消費が関与する。一方、NADHは解糖系におけるピルビン酸の前駆体であるグリセルアルデヒド3-リン酸からピルビン酸への反応を触媒する酵素の阻害因子であると考えられている。従って、乳酸発酵培地に解糖系外よりピルビン酸が添加され

ることにより、NADHが消費され、触媒阻害が解消される結果、グリセルアルデヒド3-リン酸からピルビン酸そして乳酸への反応経路がピルビン酸添加前に比して格別に円滑に進行し、乳酸生成が促進されるのではないかと推定される。勿論、本発明はこのような推定理由に限定されるものではない。

【0010】すなわち、本発明は、(1) 乳酸生成菌を外部より添加されるピルビン酸の存在下に培養して、培地中に乳酸を生成させ、生成した乳酸を採取することを特徴とする乳酸の製造方法、(2) 乳酸生成菌がコリネバクテリウム属に属することを特徴とする上記

(1) 記載の乳酸の製造方法、(3) 乳酸生成菌がコリネバクテリウム・グルタミカムであることを特徴とする上記(2) 記載の乳酸の製造方法、(4) 乳酸生成菌がプレバクテリウム属に属することを特徴とする上記(1) 記載の乳酸の製造方法、(5) 乳酸生成菌がプレバクテリウム・ラクトファーメンタムであることを特徴とする上記(4) 記載の乳酸の製造方法、(6)

乳酸生成菌を外部より添加されるピルビン酸の存在下に培養(本発明における「培養」とは、微生物の増殖を伴わない物質生産を行うことの意味も含める)して、培地中に乳酸を生成させ、培地から採取する方法により得られる乳酸、(7) ピルビン酸を含有することを特徴とする乳酸生成促進剤、に関する。

【0011】

【発明の実施の形態】本発明は特定の化合物を発酵培地に添加することを除いては公知の乳酸発酵技術を用いることができ、特に制限はない。また、本発明は所定量のピルビン酸を発酵培地に添加することにより高生産効率の乳酸製造方法を提供するものである。

【0012】本発明の発酵とは乳酸の生成が認められる限り、嫌氣的条件下または好氣的条件下のいずれで行ってもよい。発酵を嫌氣的条件下で行うか、あるいは好氣的条件下で行うかは、使用する微生物種により適宜選ばれる。本発明の発酵培地とは嫌氣的条件または好氣的条件で乳酸の生成が行われる「場」を意味し、その「場」においては使用する微生物種により、通常微生物の増殖を伴う乳酸の生成、あるいは後記する実施例などで示されるように、微生物の増殖を伴わない乳酸生成が行われる。

【0013】嫌氣的条件は例えば炭酸ガス、不活性ガス(窒素ガス、アルゴンガスなど)などの通気により、あるいは、無通気の方法により実施することができる。また、好氣的条件は酸素ガスを含む気体の通気により行うことができる。

【0014】本発明で使用する発酵微生物は糖類の存在下にL-乳酸またはD-乳酸を生成する能力のある天然から採取されたもの、あるいは乳酸生成遺伝子が機能するように形質転換されたいかなる微生物でも使用することが出来る。具体的には、例えばラクトバシルス(La

ctobacillus) 属、ストレプトコッカス(Streptococcus) 属、ペディオコッカス(Pediococcus) 属、アエロコッカス(Aerococcus) 属、カルボバクテリウム(Carlobacterium) 属、エンテロコッカス(Enterococcus) 属、エリシペロトリックス(Erysipelothrix) 属、ゲメラ(Gemella) 属、グロビカタラ(Globicatella) 属、ラクトコッカス(Lactococcus) 属、ロイコノストック(Leuconostoc) 属、テトラゲノコッカス(Tetragenococcus) 属、ヴァゴコッカス(Vagococcus) 属、コリネ型細菌(Corynebacterium, Brevibacterium)、マイコバクテリウム(Mycobacterium) 属、アースロバクター(Arthrobacter) 属、エシェリチア(Escherichia) 属、セラチア(Serratia) 属、アナエロビオスピラム(Anaerobiospirillum) 属そしてリゾプス(Rhizopus) 属に属する微生物を挙げることができ、その他、微細藻類も使用できる。

【0015】上記形質転換微生物の例としては、組み換え酵母(Appl. Environ. Microbiol., 1999, Sep; 65(9); 4211-4215) や組み換え大腸菌(Appl. Environ. Microbiol., 1999, Apr; 65(4); 1384-1389) などを挙げることができる。これら乳酸生成能を有する微生物は1種類単独でもよく、複数種を混合して用いることもできる。なお、当然のことながら、本発明の方法で製造される乳酸が食品添加剤などの用途に使用される場合には、上記の使用微生物の中でも病原性微生物の使用は避けられるべきである。

【0016】本発明の乳酸製造方法における発酵培地には、本発明の必須構成要件であるピルビン酸が乳酸生成の原料となる資化炭素源糖類に対して約1/2000モル比~1/2モル比程度(多糖類が使用される場合は単糖類への換算モル比)、好ましくは約1/500モル比~1/5モル比程度で添加される。このピルビン酸の添加により乳酸の生産効率が顕著に高められる。

【0017】本発明で使用するピルビン酸は、遊離の酸の形態であってもよく、例えばナトリウム塩、カリウム塩などの塩の形態であってもよい。

【0018】その他の発酵培地の資化炭素源としては、乳酸生成能力を有する微生物の資化炭素源として従来公知のものがいずれも使用でき、発酵微生物が生育し乳酸を生成する限りにおいて、使用微生物により適宜選択される。資化炭素源としては、例えばグルコース、マルトース、コーンスターチ、廃糖みつ、コーンステーパーカーそしてセルロース系物質からの糖類などが用いられる。

【0019】また、窒素源としては例えば尿素、酵母エキス、ヘプトンそしてホエーなどが用いられる。また、無機物栄養源として例えばリン酸カリウム、硫酸マグネシウムやFe(鉄)、Mn(マンガン)化合物なども使用される。さらには、培地のpH調整剤を使用することもできる。

【0020】乳酸の生成は回分式、連続式のいずれの生成方法も可能である。また、発酵微生物を固定化担体に担持する生成方式も可能である。乳酸発酵を行うには上記培地に乳酸生成能を有する微生物を接種し、例えば培地pHが約2～9程度、好ましくは約5～8程度で行われる。乳酸生成温度に関しては特に限定されないが、通常約20～40℃程度で行われる。しかし、使用する発酵微生物によっては更に高い温度でも可能である。乳酸生成に要する反応時間に関しても特に限定されず、本発明の効果が認められる限り任意の生成反応時間で実施される。これらの条件の最適化は当業者においては容易に定めることの出来るものである。

【0021】本発明はこのようにして生成した乳酸を採取することによりなるが、乳酸の分離濃縮手段としては従来の乳酸発酵による製造プロセスで用いられる公知の方法を用いることができる。そのような公知の方法は、例えば、1) 石灰乳を加えて中和することからなる乳酸カルシウム再結晶法、2) エーテルなどの溶媒を用いる有機溶媒抽出法、3) 生成乳酸をアルコールでエステル化するエステル化分離法、4) イオン交換樹脂を用いるクロマトグラフィ分離法、5) イオン交換膜を用いる電気透析法などが挙げられる。従って、本発明の方法により得られる乳酸は、遊離型の乳酸のみならず、例えばナトリウム、カリウムなどとの塩や、例えばメチルエステル、エチルエステルなどのエステルの形態であってもよい。

【0022】

【実施例】以下、実施例でもって本発明を説明するが本発明はこのような実施例に限定されるものではない。

【0023】【実施例1】

コリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC13032による乳酸の生成および採取

尿素4g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 14g、 KH_2PO_4 0.5g、 K_2HPO_4 0.5g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 20mg、 $\text{MnSO}_4 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ 20mg、D-ビオチン200μg、塩酸チアミン100μg、酵母エキス1g、カザミノ酸1gおよび蒸留水500ml (pH6.6)の培地を100mlずつ500ml容の三角フラスコに分注し、120℃、15分間滅菌処理したものに滅菌済み50%グルコース水溶液4mlを加え、コリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC13032を植菌し、33℃にて14時間振とう培養した(好氣的培養)。培養終了後、遠心分離(8000g、20分)により菌体を回収した。得られた菌体全量を以下の反応に供試した。

【0024】 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 23g、 KH_2PO_4 0.5g、 K_2HPO_4 0.5g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 20mg、 $\text{MnSO}_4 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ 20mg、D-ビオチン200μg、塩酸チアミン100μg、蒸留水500mlの培地を1L容のジャーファーマンターに入れ、グルコース180mMを資化炭素源として加え、ピルビン酸ナトリウム10mMを添加後、上記菌体の全量を加えて密閉した状態で33℃にてゆるく攪拌し(200rpm)、反応させた。4時間後、培養液を遠心分離(8000rpm、15分、4℃)、得られた上清液を分析したところ、乳酸生成量は77.4mMであった。また、グルコース消費量は64.1mMであった。

【0025】【実施例2】～【実施例5】乳酸生成反応時間をそれぞれ表1記載の反応時間に変えた以外は、実施例1と全く同じ方法、条件で行い、これらの反応結果を表1に示した。

【0026】【比較例1】～【比較例5】反応系にピルビン酸ナトリウムを添加しないで、表1に示した反応時間で実施例1と全く同様の反応を行った。これらの反応結果を表1に示した。

【0027】

【表1】

実施例番号		2	1	3	4	5
反応時間(h r)		2	4	6	8	10
反応結果						
ビルビン酸 添加 (10mM)	乳酸生成量(A) (mM)	38.2	77.4	114.3	149.8	182.2
	グルコース消費量(B) (mM)	32.6	64.1	97.0	120.5	143.7
比較例番号		1	2	3	4	5
反応時間(hr)		2	4	6	8	10
反応結果						
ビルビン酸 添加 なし	乳酸生成量(C) (mM)	13.0	25.1	39.1	52.1	65.1
	グルコース消費量(D) (mM)	10.5	20.4	30.6	40.7	50.9
添加効果	乳酸生成量増大(mM) [(A) - (C)]	25.2	51.3	75.2	97.7	117.1
	グルコース消費量 増大(mM) [(B) - (D)]	22.1	43.7	66.4	79.8	92.8

【0028】表1から明らかなように、添加されたビルビン酸ナトリウム量よりも乳酸生成量が著しく増大する効果が認められ、乳酸生成速度が顕著に向上している。そして、ビルビン酸添加により、グルコース消費量ならびに消費速度が大いに高められている。また、このようなビルビン酸添加効果が長時間にわたって継続していることも明確である。

【0029】〔実施例6〕ビルビン酸ナトリウムの添加量を30mMとする以外は、実施例1で用いた微生物種 *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032により同一の反応方法、条件により乳酸生成反応を実施した。反応時間は2時間で行い、これらの結果を表2に示す。

【0030】〔実施例7〕ビルビン酸ナトリウムの添加量を30mMとする以外は、実施例1で用いた微生物種 *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032により同一の反応方法、条件により乳酸生成反応を実施した。反応時間は4時間で行い、これらの結果を表2に示す。

【0031】

【表2】

実施例番号		6	7
反応時間(hr)		2	4
反応結果			
ビルビン酸 添加 (30mM)	乳酸生成量(A) (mM)	43.6	88.7
	グルコース消費量(B) (mM)	35.8	71.3
比較例番号		1	2
反応時間(hr)		2	4
反応結果			
ビルビン酸 添加 なし	乳酸生成量(C) (mM)	13.0	26.1
	グルコース消費量(D) (mM)	10.5	20.4
添加効果	乳酸生成量増大(mM) [(A) - (C)]	30.6	62.6
	グルコース消費量 増大(mM)	25.3	50.9
	[(B) - (D)]		

【0032】表2からも明らかにされているように、顕著な乳酸生成量およびグルコース消費量の増大が認められ、それらの速度も非常に大きく増大している。

【0033】【実施例8】

プレビバクテリウム・ラクトファーメンタム(*Brevibacterium lactofermentum*) ATCC13869による乳酸の生産

実施例1と同様の方法、条件に従い、プレビバクテリウム・ラクトファーメンタム(*Brevibacterium lactofermentum*) ATCC13869を好気的に培養後、実施例1と同様の方法、条件で嫌氣的に乳酸生成反応を行った。反応時間は2時間で行った。反応終了後、反応液を分析した結果を表3に示す。

【0034】【実施例9】実施例1と同様の方法、条件に従い、プレビバクテリウム・ラクトファーメンタム(*Brevibacterium lactofermentum*) ATCC13869を好気的に培養後、実施例1と同様の方法、条件で嫌氣的に乳酸生成反応を行った。反応時間は4時間で行った。反応終了後、反応液を分析した結果を表3に示す。

【0035】【実施例10】実施例1と同様の方法、条件に従い、プレビバクテリウム・ラクトファーメンタム(*Brevibacterium lactofermentum*) ATCC13869

9を好気的に培養後、実施例1と同様の方法、条件で嫌氣的に乳酸生成反応を行った。反応時間は6時間で行った。反応終了後、反応液を分析した結果を表3に示す。

【0036】【実施例11】実施例1と同様の方法、条件に従い、プレビバクテリウム・ラクトファーメンタム(*Brevibacterium lactofermentum*) ATCC13869を好気的に培養後、実施例1と同様の方法、条件で嫌氣的に乳酸生成反応を行った。反応時間は8時間で行った。反応終了後、反応液を分析した結果を表3に示す。

【0037】【実施例12】実施例1と同様の方法、条件に従い、プレビバクテリウム・ラクトファーメンタム(*Brevibacterium lactofermentum*) ATCC13869を好気的に培養後、実施例1と同様の方法、条件で嫌氣的に乳酸生成反応を行った。反応時間は10時間で行った。

【0038】【比較例6】ビルビン酸ナトリウムを添加しないことを除いては、実施例8で使したプレビバクテリウム・ラクトファーメンタム(*Brevibacterium lactofermentum*) ATCC13869を用いて、実施例8の方法、条件に従い、反応時間2時間で乳酸生成反応を行った。反応終了後、反応液を分析した結果を表3に示す。

【0039】【比較例7】ビルビン酸ナトリウムを添加しないことを除いては、実施例8で使したプレビバクテリウム・ラクトファーメンタム(*Brevibacterium lactofermentum*) ATCC13869を用いて、実施例8の方法、条件に従い、反応時間4時間で乳酸生成反応を行った。反応終了後、反応液を分析した結果を表3に示す。

【0040】【比較例8】ビルビン酸ナトリウムを添加しないことを除いては、実施例8で使したプレビバクテリウム・ラクトファーメンタム(*Brevibacterium lactofermentum*) ATCC13869を用いて、実施例8の方法、条件に従い、反応時間6時間で乳酸生成反応を行った。反応終了後、反応液を分析した結果を表3に示す。

【0041】【比較例9】ビルビン酸ナトリウムを添加しないことを除いては、実施例8で使したプレビバクテリウム・ラクトファーメンタム(*Brevibacterium lactofermentum*) ATCC13869を用いて、実施例8の方法、条件に従い、反応時間8時間で乳酸生成反応を行った。反応終了後、反応液を分析した結果を表3に示す。

【0042】【比較例10】ビルビン酸ナトリウムを添加しないことを除いては、実施例8で使したプレビバクテリウム・ラクトファーメンタム(*Brevibacterium lactofermentum*) ATCC13869を用いて、実施例8の方法、条件に従い、反応時間10時間で乳酸生成反応を行った。反応終了後、反応液を分析した結果を表3に示す。

【0043】

【表3】

実施例番号		8	9	10	11	12
反応時間(hr)		2	4	6	8	10
反応結果						
ビルビン酸 添加 (10mM)	乳酸生成量(A) (mM)	37.5	76.0	111.2	144.9	176.1
	グルコース消費量(B) (mM)	31.5	62.1	93.8	117.1	139.1
比較例番号		6	7	8	9	10
反応時間(hr)		2	4	6	8	10
反応結果						
ビルビン酸 添加 なし	乳酸生成量(C) (mM)	12.5	25.0	38.0	50.2	62.8
	グルコース消費量(D) (mM)	10.0	19.5	29.5	39.1	50.1
添加効果	乳酸生成量増大(mM) [(A) - (C)]	25.0	51.0	73.2	94.7	113.3
	グルコース消費量 増大(mM) [(B) - (D)]	21.5	42.6	64.3	78.0	89.0

【0044】表3より、微生物種に依らず、ビルビン酸添加効果が発現されることが明らかにされた。

【0045】

【発明の効果】本発明の乳酸製造方法により、乳酸発酵の際に乳酸の生産効率を著しく向上させることができ、

良好な風味を有する乳酸を得ることができる。該乳酸は、食品添加剤として清酒、ビール、清涼飲料、漬物、醤油あるいは製パンなどの製造、医薬品、農薬あるいは化粧品などの化学原料として利用することができる。

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁷

C12R 1:01

識別記号

F I

テーマコード(参考)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.